

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460522

研究課題名(和文)トリパノソーマ原虫における複合型糖鎖合成経路のミッシングリンクの解明

研究課題名(英文)Elucidation of a synthetic pathway for complex-type N-linked glycans in *Trypanosoma brucei*

研究代表者

中西 雅之(Nakanishi, Masayuki)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：00281048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類に寄生するアフリカトリパノソーマ原虫は生存および増殖のために複合型糖鎖を必要とすると考えられているが、その合成の初発段階を触媒する酵素GnT-Iは、ゲノム解析では見つからない。本研究ではトリパノソーマ原虫の抽出液中に見いだされるGnT-I活性を指標として、その同定を試み、TbGT11と呼ばれるタンパク質を必須の構成因子とする約400 kDaのタンパク質複合体であることを強く示唆する結果を得た。さらに、TbGT11自身がN-結合型糖鎖で修飾されることがGnT-I活性に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Trypanosoma brucei, a causative parasite of African Sleeping sickness, is thought to require the expression of complex-type N-linked glycans for its proliferation. However, little is known about the responsible enzymes for the glycan synthesis. Especially, lack of a homolog to GnT-I was a mystery for years. This project focused on the identification of the enzyme of T. brucei (TbGnT-I). Although TbGT11 was reported as the TbGnT-I in the middle of this project, it was still not clear whether the enzyme was alone sufficient to catalyze GnT-I activity. We found that native TbGnT-I showed a size of ca. 400 kDa by a gel filtration chromatography, and overexpressed TbGT11HA3 was also contained in the fraction. The recombinant TbGT11HA3 showed no activity when expressed in other than T. brucei. An N-linked glycosylation on TbGT11 was essential for the activity. These results strongly suggested that TbGnT-I was a 400-kDa protein complex containing glycosylated TbGT11 as an essential component.

研究分野：生化学・分子寄生虫学

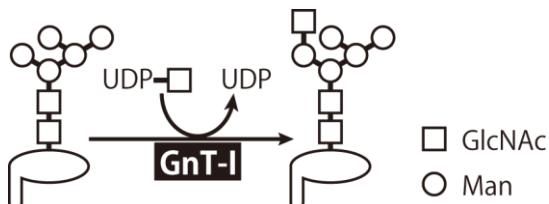
キーワード：トリパノソーマ原虫 糖鎖 糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

アフリカ睡眠病は「顧みられない熱帯病」の代表的なもののひとつで、致死性の感染症である。その病原体は吸血性のハエ（ツエツエバエ）によって運ばれ、ヒトや家畜に寄生するアフリカトリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma brucei*) である。原虫とは単細胞の真核生物で寄生性かつ病原性のもを言う。*T. brucei* は、寄生直後は末梢血中で分裂増殖を繰り返すが、やがて中枢神経系に侵入して、睡眠リズムの攪乱、昏睡などの重篤な症状を引き起こし、最終的に宿主を殺してしまう。中枢神経系に侵入した原虫を殺滅してアフリカ睡眠病を治療するには、ヒ素化合物であるメラルソプロールが使用されるが、毒性が高いため副作用で落命するケースも5%に達する。この病気への安全な治療法を開発するには、原虫の代謝経路を理解し、弱点となるタンパク質の同定を進めることが合理的な戦略である。

動物の血流中に寄生する *T. brucei* は、宿主免疫の攻撃を避けたり、増殖を維持したりするために、原虫表面を覆う糖タンパク質を利用する (Garg, N. (1998) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 10, 439; Roper, J.R. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 5884)。糖タンパク質は、糖鎖を共有結合したタンパク質である。従って、糖鎖は *T. brucei* にとって不可欠の内在性分子であり、糖鎖合成経路は抗トリパノソーマ薬の標的になると考えられる。*T. brucei* が作る糖鎖にはタンパク質のアスパラギン側鎖を修飾する N-結合型糖鎖と糖脂質であるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを修飾する糖鎖が知られており、N-結合型糖鎖には哺乳動物と同様の高マンノース型やガラクトースを含む複合型糖鎖が、GPI アンカーを修飾する糖鎖には *T. brucei* 特有のオリゴガラクトース鎖やポリ LacNAc 鎖が存在する (Izquierdo, L. et al. (2009) *Mol. Microbiol.* 71, 478)。

しかし、*T. brucei* における複合型糖鎖や GPI アンカー修飾糖鎖の合成経路はほとんどわかっていなかった。とりわけ、複合型糖鎖合成の初発段階に必要な β -1,2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I (GnT-I) は、ヒト、マウス、ショジョウバエや回虫で同定された酵素との配列相同性を指標にしてゲノム配列を精査しても検出



できず、複合型糖鎖合成経路のミッシングリンクとなっていた。*T. brucei* の GnT-I (TbGnT-I) が相同性解析で見つからないということは、ヒトの酵素とは構造が顕著に異なることを示唆しており、特異的な阻害剤の

設計に有利であると見込まれた。一方で、GnT-I とは異なるファミリーに分類される糖転移酵素 (β 3GnT) の遺伝子は、*T. brucei* のゲノム上に 21 種類が存在することは知られていたが、そのうち機能が解明されていたのは 1 種類のみで、GPI アンカーを修飾するポリラクタサミン鎖の合成に関与するものであった。

申請者は *T. brucei* ライセートの沈殿画分に GnT-I 活性を検出することに成功していた。この検出系を用いることで、活性をもった TbGnT-I を部分的に精製し、さらに質量分析法および無細胞発現系を組み合わせることで *T. brucei* 由来 GnT-I (TbGnT-I) を同定できると見込まれた。無細胞発現系は、細胞を利用した系では発現させられないタンパク質 (マラリア原虫由来タンパク質など) でも高い確率で発現させられ、発現系由来の糖鎖修飾機構が除かれているため TbGnT-I の活性測定を妨害しない利点があった。

2. 研究の目的

本研究では TbGnT-I を同定し、*T. brucei* における複合型糖鎖合成経路のミッシングリンクを埋めるとともに、ヒト GnT-I (HsGnT-I) と性状を比較することおよびその酵素活性が *T. brucei* の生存に与える影響を明らかにすることを目的とした。TbGnT-I は相同性解析で検出されないことから、その一次構造は HsGnT-I のものと大きく異なると予想された。このことは、HsGnT-I を阻害せず、TbGnT-I を特異的に阻害できる化合物を見いだせる可能性を示している。従って、TbGnT-I が *T. brucei* の生存に不可欠であれば、抗トリパノソーマ薬の新しい標的になると期待できる。また、TbGnT-I の生化学的性質を HsGnT-I の性質と比較することで、N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性発現メカニズムについて新しい知見を得ることができる。

3. 研究の方法

T. brucei の培養---本研究では動物宿主中での形態である血流型の *T. brucei* を使用した。使用株は、Single-Marker 株として知られる、テトラサイクリンリプレッサーと T7RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する株で、HMI-9 培地中、CO₂ 濃度 5%、37°C で培養した。

TbGnT-I の部分精製---*T. brucei* を培養液から回収、洗浄後、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む低張溶液に懸濁し、さらに急速凍結・融解することで原虫ライセートを調製した。このライセートを遠心分離して沈殿を回収し、界面活性剤を含む緩衝液 (20 mM TrisHCl, 0.4 M NaCl, 1% DDM, pH7.4) で溶解した。不溶性成分を遠心分離で除いたのち、上清を Superdex 200 increase カラムによるゲルろ過で分離し、GnT-I 活性を示す画分を回収した。

GnT-I 活性測定---酵素溶液を、0.25 M HEPES pH6.5, 2 mg/mL BSA, 0.2% Triton X100, 20 mM UDP-GlcNAc, 86 mM GlcNAc, 30 mM MnCl₂, 1 μM ピリジルアミノ化糖鎖 (Man₃GlcNAc₂-PA) の存在下、37°Cで 16 時間反応させた。その後、酵素を熱失活させ、不溶性沈殿を除いたのちに、生成した GlcNAcMan₃GlcNAc₂-PA を高速液体クロマトグラフィーで分離定量して酵素活性を算出した。

プロテオーム解析---SDS-PAGE で分離した試料を、CBB または銀染色で可視化し、得られたバンドに含まれるタンパク質をゲル内でトリプシン消化した。消化で得られたペプチドは ESI-Q-TOF 型質量分析計でタンデム質量分析し、MASCOT 解析によりタンパク質を同定した。

T. brucei を用いた TbGT11HA₃ の発現---TbGT11 の C 末端に 3 回繰り返し HA タグ (HA₃) を付加したタンパク質の遺伝子を pLew100 プラスミドに挿入し、プラスミドを直鎖化後、*T. brucei* にトランスフェクトした。相同組換えにより、rDNA 座位が TbGT11HA₃ 発現カセットに組み換えられた株をフレオマイシン耐性を指標に選別し、TbGT11HA₃ 過剰発現株を得た。この株をテトラサイクリン含有培地で培養し、標的タンパク質を発現させた。

プルダウン精製---TbGT11HA₃ 発現誘導株から、上述の方法で TbGnT-I 画分を調製し、抗 HA 抗体標識ビーズを混和して 4°Cで 1 時間反応させた。ビーズはスピンカラムを用いて回収、洗浄した後、HA ペプチドと混和して、結合タンパク質を競合的に溶出した。

ノックアウト株の作製---TbGT11 遺伝子の上流および下流のそれぞれ約 0.5 kbp を連結したハイグロマイシン耐性遺伝子を、pGEM-5zf ベクターにクローニングしてノックアウトプラスミドとした。ノックアウトプラスミドを直鎖化後、*T. brucei* にトランスフェクトし、ハイグロマイシン存在下に増殖する原虫を選別して、TbGT11 遺伝子が薬剤耐性遺伝子に置換された株を得た。*T. brucei* は二倍体であるため、次いでピューロマイシン耐性遺伝子を用いた同様の手順を繰り返す。両アレルが薬剤耐性遺伝子に置換されたノックアウト株を得た。

無細胞発現---コムギ無細胞発現キット WEPRO1240H (セルフリーサイエンス社) を用いて、マニュアルに従ってタンパク質を合成した。N 末端に His6 タグまたは C 末端に HA₃ タグを付した標的タンパク質の遺伝子を pEU ベクターにクローニングし、これを鋳型にした *in vitro* 転写で mRNA を合成した。この mRNA を翻訳反応系に加えた後、17°Cに 20 時間静置してタンパク質を合成した。タンパク質複合体の形成を調べる際には、複数種の mRNA を混和して翻訳させた。また、生体膜環境を模倣するために、アズレクチンで調製したリポソームを翻訳系に共存させた。

哺乳細胞発現---哺乳細胞用発現プラス

ミド pRK5 に TbGT11HA₃ の遺伝子をクローニングし、リポフェクション法で COS7 細胞に導入して、一過性に発現を誘導した。

リーシュマニア発現---トリパノソーマ科に属するリーシュマニア原虫、*Leishmania tarentolae*, で標的タンパク質を構成的に発現させた。標的タンパク質をコードする遺伝子を pLEXSY-sat2 または pLEXSY-neo2 プラスミドにクローニングし、直鎖化して *L. tarentolae* にエレクトロポレーション法で導入した。ノーセオスリシンまたは G418 を含む寒天培地上で耐性株を選別した。得られた原虫は、26°Cのインキュベータ中、液体培地 (BHI 培地) を用いて培養し、*T. brucei* の場合と同様にライセートを調製した。

4. 研究成果

TbGnT-I 活性---UDP-GlcNAc から糖タンパク質糖鎖末端へ GlcNAc を転移する GnT-I 活性は、HsGnT-I の場合、Man₅GlcNAc₂-PA および Man₃GlcNAc₂-PA のいずれをも受容基質とすることが知られている。本研究において無細胞系で発現させた HsGnT-I でもその酵素活性を確認した。一方で、*T. brucei* から調製した TbGnT-I 画分は、Man₃GlcNAc₂-PA に GlcNAc を転移できず、Man₃GlcNAc₂-PA のみを受容基質とした。また、反応生成物は Man₃GlcNAc₂-PA の α3 アームに GlcNAc が転移した糖鎖であり、α6 アームに転移したものは検出されなかったことより、この画分には GnT-II 活性は含まれていないことが確認された。TbGnT-I 活性は *T. brucei* ライセートの沈殿画分に存在したため、界面活性剤で可溶化して高分離能ゲルろ過カラム Superdex 200 increase で分画した。TbGnT-I 活性は分画分子量 400 kDa 付近に溶出されたことから、多量体を形成していることが示唆された。また、反応条件を検討したところ、至適 pH は 6.0~6.5 にあること、Mg²⁺もしくは Mn²⁺を要求することが判明し、これらの点では HsGnT-I と同様であった。

プロテオーム解析---TbGnT-I を同定するため、ゲルろ過クロマトグラフィーで分画した試料を SDS-PAGE で分離し、出現したタンパク質バンドの網羅的同定を質量分析で行ったところ、BiP やグリコソーム (*T. brucei* において糖代謝を担う細胞内オルガネラ) に含まれる酵素群が主に見いだされた。これらをコムギ無細胞発現系で合成し、TbGnT-I 活性を調べたがいずれにも糖転移活性は検出されなかった。

TbGT11HA₃ の発現---2014 年になって TbGnT-I をコードする遺伝子として Tb927.3.5660 が報告され (*J. Biol. Chem.* (2014) 289, 9328), そのタンパク質が TbGT11 と命名された。TbGT11 は、糖タンパク質糖鎖の Gal 末端に GlcNAc を転移させるヒト酵素 (B3GnT, GT31 ファミリー) の相同タンパク質として見いだされた酵素であり、*T. brucei* のゲノムに 21 種類見つかる酵素のひとつで

ある。この遺伝子をノックアウトした株は複合型糖鎖の合成能をほぼ失うこと、およびノックアウト株に発現させた TbGT11HA3 は $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2 \rightarrow \text{GlcNAc}$ を転移する活性を示すことが報告された。これを受け、本研究でも再現実験を行い、同様の結果を得た。また、TbGnT-I 活性を失った *T. brucei* は増殖速度が低下しないことから、複合型糖鎖の合成は *T. brucei* にとって必須でないことも確認した。一方で、コムギ無細胞系で発現させた TbGT11HA3 には、TbGnT-I 活性が検出されなかった。TbGT11 は N 末端に一回膜貫通領域を持つ II 型膜タンパク質であるためリポソーム存在下での発現も試みたが、機能的な酵素は得られなかった。これらのことと、TbGnT-I の未変性分子量が約 400kDa であることを考えると、TbGnT-I は複合体酵素で、TbGT11 は複合体形成もしくは触媒活性に必須の因子の一つであると推測された。

TbGnT-I 複合体の分析---そこで、TbGT11HA3 を過剰発現する *T. brucei* を作製し、抗 HA 抗体による免疫沈降法で TbGT11HA3 を含む複合体を精製した。この分画を SDS-PAGE で分離し、TbGT11HA3 を発現しない対照試料と比較すると、75 kDa および 50 kDa 付近に特異的なタンパク質バンドが見いだされた。これらを nano LC-MSMS で解析したところ、TbGT11 の他に様々な鞭毛関連タンパク質や機能未知タンパク質が含まれていることが分かった。これらの遺伝子をクローニングし、N 末端 His6 タグタンパク質として無細胞系で TbGT11HA3 と共に発現させた。これを抗 HA 抗体で免疫沈降し、抗 His6 タグ抗体で検出したところ、機能未知タンパク質のうちの一つが TbGT11HA3 と複合体を形成していることが分かった。しかし、この複合体には TbGnT-I 活性が検出されなかったことより、機能的な TbGnT-I 複合体の構成にはさらに別の因子が必要なことが分かった。

TbGT11 の変異解析---TbGT11 には C 末端領域に 3 か所の N-結合型糖鎖修飾モチーフ（シークオン配列）が存在する。そこで、機能的 TbGnT-I 複合体の形成に、TbGT11 への糖鎖修飾が及ぼす影響を検証した。TbGT11HA3 の 3 か所のシークオン配列を個別にまたは一斉にアミノ酸置換（Ser/Thr を Ala へ）し、TbGT11 ノックアウト *T. brucei* に発現させた。抗 HA 抗体によるイムノプロットにおいて、各変異体は異なる移動度を示し、野生型酵素が 54 kDa、3 か所一斉変異酵素が 49k Da であった。1 か所だけに変異を導入した酵素は、両者の中間の分子量を示した。これらの TbGnT-I 活性を測定したところ、最も N 末端側のシークオン配列を変異させた酵素は不活性であった。すなわち、この部位への N-結合型糖鎖の結合が活性に必須の機能を果たしていることが明らかになった。なお、一斉変異酵素も不活性であり、糖鎖修飾機構を持たないコムギ無細胞系で発現させた野生型酵素と同じ分子量を示した。このことは、

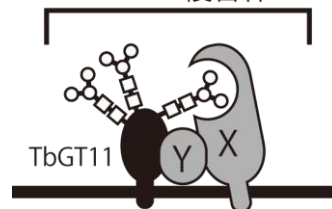
コムギ無細胞系を用いた発現スクリーニングは HsGnT-I の場合は有効であるものの、TbGnT-I の探索には適していないことを示している。

動物細胞発現---糖鎖修飾を受ければ、TbGT11 は単独でも TbGnT-I 活性を有する可能性があるため、哺乳類細胞である COS7 細胞で野生型 TbGT11HA3 を発現させた。COS7 細胞では哺乳類型の糖鎖修飾反応が進行する。こうして得られた組換え TbGT11HA3 は *T. brucei* で発現させたのと同じ分子量を示し、糖鎖修飾を受けていることが確認されたが、TbGnT-I 活性は示さなかった。以上より、TbGnT-I の活性発現には糖鎖修飾だけでは不十分であることが分かった。

リーシュマニアでの発現---糖鎖修飾機構を持ち、複数タンパク質の共発現が可能なタンパク質発現系として、*T. brucei* と同科の原虫である *L. tarentolae* を選び、TbGT11HA3 を発現させた。この原虫で発現させた TbGT11HA3 は、*T. brucei* で発現させた場合と同じ分子量を示したが、他の発現系と同様に TbGnT-I 活性は示さなかった。ここに、複合体形成候補タンパク質の C 末端に Myc タグを付した発現カセットを多重導入して TbGnT-I 複合体の構成を試みた。しかし、組換えタンパク質の発現はイムノプロットで検出できたものの、活性の検出には至らなかった。

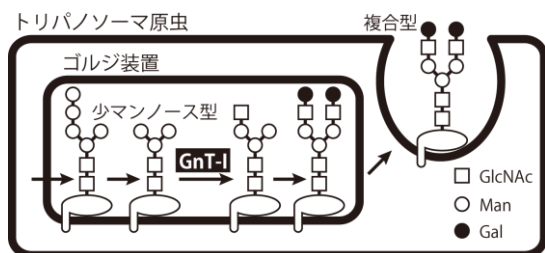
以上より、TbGnT-I は N-結合型糖鎖修飾を受けた TbGT11 を必須の構成因子とする糖タンパク質複合体であることを強く示唆する結果を得た。TbGT11 は糖転移酵素としての構造的特徴を有しているが、既知の GnT-I とは異なるファミリーに属していることから、TbGnT-I 触媒反応を担う本体は別に存在する可能性も残されている。これの直接的な証明には *in vitro* または異種細胞での機能的な酵素の再構成が必要であるが、本研究では再構成には至らなかった。一方で、天然型 TbGnT-I の性状をはじめて明らかにした。さらに、TbGT11 を修飾する糖鎖の重要性を発見した。この糖鎖の役割としては、未変性分子量約 400 kDa の TbGnT-I 複合体形成への関与が考えられる。複合体構成因子の中にレクチン様の活性を持つ分子が存在し、それが機能的な TbGnT-I の形成に必要なかもしれない。また、TbGT11 のノックアウト

TbGnT-I 複合体



実験より TbGnT-I 活性が *T. brucei* の生存・増殖に必須ではないことを示し、本原虫における複合型糖鎖の機能は従来考えられていたほど重要でないことも明らかにした。今後は、TbGnT-I 複合体がどのような分子で構成され、糖鎖がそれにどうやって関与して

いるのかを解明することが課題である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計7件)

①中西 雅之, 木下 かおり, 眞鍋 綾香, 日野 真美, 野元 裕, 糖転移酵素 GnT-I のアフリカトリパノソーマ原虫とヒトにおける相違, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

②眞鍋 綾香, 木下 かおり, 日野 真美, 野元 裕, 中西 雅之, アフリカトリパノソーマ原虫が有する糖転移酵素 TbGT11 の糖鎖修飾が複合型糖鎖の形成に及ぼす影響, 第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2015年10月31日~11月1日, 高知市文化プラザかるぽーと (高知県・高知市)

③中西 雅之, *Trypanosoma brucei* の糖鎖合成酵素 TbGnT-I の活性発現には N-結合型糖鎖が必要である, 第23回分子寄生虫学ワークショップ・第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2015年8月30日~9月2日, 帯広畜産大学 (北海道・帯広市)

④中西 雅之, 野元 裕, ドリコール上での N-結合型糖鎖前駆体の形成は *Trypanosoma brucei* の生存に必須である, 第84回日本寄生虫学会大会, 2015年3月21日~22日, 杏林大学 (東京都・三鷹市)

⑤ Masayuki Nakanishi, Ayaka Manabe, Hiroshi Nomoto, Characterization of a glycosyltransferase involved in priming of the synthesis of complex-type N-linked glycans in *Trypanosoma brucei*, 13th International Congress of Parasitology, 2014年8月10日~15日, Mexico City (Mexico)

⑥中西 雅之, 野元 裕, *Trypanosoma brucei* 由来 N-アセチルグルコサミン転移酵素-I (GnT-I) の分離とプロテオーム解析, 第83回日本寄生虫学会大会, 2014年3月27日~28日, 愛媛大学 (愛媛県・松山市)

⑦中西 雅之, 眞鍋 綾香, 野元 裕, *Trypanosoma brucei* が有する N-アセチルグルコサミン転移酵素-I (GnT-I) の性状解析, 第11回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2013年10月2日~3日, 長崎大学 (長崎県・長崎市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.matsuyama-u.ac.jp/~mnakanis>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 雅之 (NAKANISHI, Masayuki)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号: 00281048